

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-219103

(P2004-219103A)

(43) 公開日 平成16年8月5日(2004.8.5)

(51) Int.Cl.⁷

G01N 33/53
C12M 1/00
C12N 15/09
C12Q 1/68
G01N 21/64

F I

G01N 33/53
C12M 1/00
C12Q 1/68
G01N 21/64
G01N 21/77

テーマコード(参考)

2G043
2G054
4B024
4B029
4B063

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2003-3447 (P2003-3447)

(22) 出願日

平成15年1月9日 (2003.1.9)

(71) 出願人 000006035

三菱レイヨン株式会社

東京都港区港南一丁目6番41号

(72) 発明者 伊藤 千穂

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号

三菱レイヨン株式会社化成品開発研究所内

(72) 発明者 石丸 哲太

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号

三菱レイヨン株式会社化成品開発研究所内

F ターム(参考) 2G043 AA04 BA16 DA02 EA01 EA19
FA03 GA07 GB21 JA03 KA03
KA09 LA03 MA04
2G054 BB03 CA22 CE02 EA03 GA04
4B024 AA11 AA19 CA01 CA09 CA11
HA11 HA13 HA14 HA20

最終頁に続く

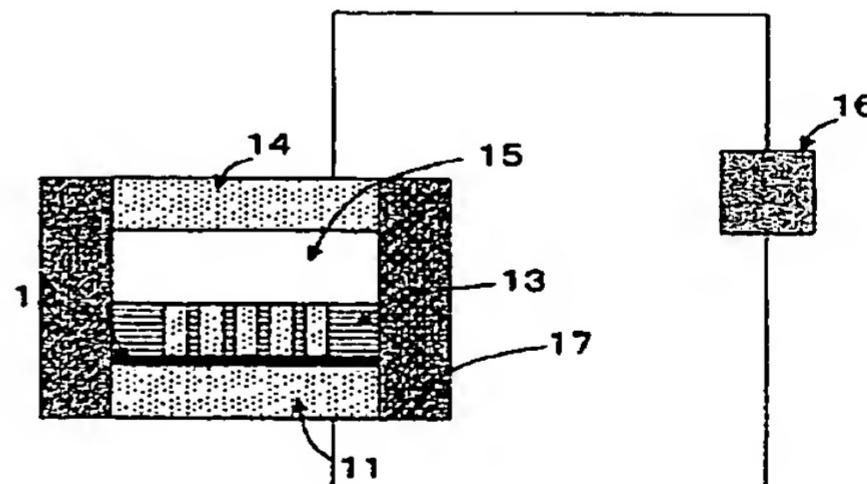
(54) 【発明の名称】電気泳動装置及びそれを用いた生体関連物質の検出方法

(57) 【要約】

【課題】微量の検体を、できるだけ短時間に効率的に検出することが可能な電気泳動装置および検出法の提供。

【解決手段】第1電極、第2電極、半透膜、バイオチップ、検体溶液槽の構成を含み、第1電極、半透膜、バイオチップは順に積層構造を形成しており、バイオチップと第2電極の間には所定の容積を有する検体溶液槽が形成されている電気泳動装置。さらには、第1電極、第2電極、半透膜、バイオチップ、検体溶液槽の構成を含み、半透膜、バイオチップは積層構造を形成しており、第1電極と半透膜の間には所定の容積を有するバッファー溶液槽が形成され、バイオチップと第2電極の間には所定の容積を有する検体溶液槽が形成されている電気泳動装置。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第1電極、第2電極、半透膜、バイオチップ、検体溶液槽の構成を含み、第1電極、半透膜、バイオチップは順に積層構造を形成しており、バイオチップと第2電極の間には所定の容積を有する検体溶液槽が形成されている電気泳動装置。

【請求項 2】

第1電極、第2電極、半透膜、バイオチップ、検体溶液槽の構成を含み、半透膜、バイオチップは積層構造を形成しており、第1電極と半透膜の間には所定の容積を有するバッファー溶液槽が形成され、バイオチップと第2電極の間には所定の容積を有する検体溶液槽が形成されている電気泳動装置。 10

【請求項 3】

第1電極及び／又は第2電極が、絶縁体に固定されており、該絶縁体が透明材料で構成されている請求項1又は2記載の電気泳動装置。

【請求項 4】

第1電極及び／又は第2電極が、それぞれ互いに並列に接続された複数の電極からなる、請求項1又は2記載の電気泳動装置。

【請求項 5】

請求項1～4のいずれかに記載の電気泳動装置の検体溶液槽を検体溶液で満たし、第1電極と第2電極の間に、第1電極が正極となるように電圧を印加することを特徴とする生体関連物質の検出方法。 20

【請求項 6】

次いで、第1電極と第2電極の間に、第1電極が負極となるように電圧を印加することを含む請求項5記載の生体関連物質の検出方法。

【請求項 7】

請求項5又は6記載の生体関連物質の検出方法において、検体に蛍光分子を結合し、検出光を第1電極又は第2電極の形成する平面を透過させ、バイオチップ表面に直角に照射し、蛍光分子の蛍光を検出することを含む生体関連物質の検出方法。

【請求項 8】

生体関連物質が核酸である請求項5～7のいずれかに記載の生体関連物質の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、核酸等の生体関連物質を検出するための電気泳動用装置及びそれを用いた生体関連物質の検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、病気の診断、原因の解明のために、バイオチップ(DNAマイクロアレイ、DNAチップ等)とよばれる検査ツールが使用され始めており、さまざまな形態のバイオチップが開発されつつある。

【0003】

バイオチップとして、代表的な製法としては、化学的又は物理的に修飾した基盤上に核酸をスポットティングして固定化する方法(例えば、非特許文献1参照)、シリコン等の基盤の上にフォトグラフィー技術により短鎖の核酸を直接固相合成していく方法が知られている(例えば、特許文献1及び2参照)。また、核酸等の生体関連物質プローブがゲルに固定化されているDNAチップが開発されている(特許文献3及び4参照)。その他、自己アドレス可能な電極上にDNAプローブを固定したチップがある(特許文献5参照)。 40

【0004】

核酸検出においては、安価な検出装置を用いて、より微量の検体を、できるだけ短時間に検出することが所望されている中、特許文献3～5に開示されているバイオチップは、電気泳動法を採用することにより、ゲル中に保持されているプローブと検体とをハイブリダ

イゼーション操作、ハイブリダイズしなかった不要な検体の洗浄操作及びデハイブリ操作が簡便かつ高速に実施できることが期待される。そのような電気泳動可能なバイオチップとして、特許文献4及び5に核酸検出法および核酸検出装置が開示されている。

【0005】

【非特許文献1】

Science 270, 467-470 (1995)

【0006】

【特許文献1】

米国特許第5, 445, 934号明細書

【0007】

【特許文献2】

米国特許第5, 774, 305号明細書

【0008】

【特許文献3】

特開2000-270878号公報

【0009】

【特許文献4】

特開2000-60554号公報

【0010】

【特許文献5】

特表平10-505497号公報

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、特許文献4に開示された核酸検出法および核酸検出装置においては、試料核酸が電気泳動によりゲルから正極側に流れ出ることから、加えた検体を高い効率でハイブリダイズすることができない。

【0012】

また、特許文献5に開示されたバイオチップにおいては、試料核酸を電極上に濃縮することから、微量の検体を短時間に検出することができるが、自己アドレス可能な電極パターンの形成が煩雑であるため、装置が高価であり、電極上への核酸の固定化のプロセスが別途必要であるためプロセスが煩雑である。
30

【0013】

本発明は、上記課題を解決した電気泳動装置及びそれを用いた検出法を提供する。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題に鑑み銳意検討した結果、特定の構成からなる電気泳動用装置を使用することにより、加えた検体を高い効率で簡便にハイブリダイズすることができることを見いだし、本発明を完成した。

【0015】

すなわち、本発明は、第1電極、第2電極、半透膜、バイオチップ、検体溶液槽の構成を含み、第1電極、半透膜、バイオチップは順に積層構造を形成しており、バイオチップと第2電極の間には所定の容積を有する検体溶液槽が形成されている電気泳動装置、である。
40

【0016】

また、本発明は、第1電極、第2電極、半透膜、バイオチップ、検体溶液槽の構成を含み、半透膜、バイオチップは積層構造を形成しており、第1電極と半透膜の間には所定の容積を有するバッファー溶液槽が形成され、バイオチップと第2電極の間には所定の容積を有する検体溶液槽が形成されている電気泳動装置、である。

【0017】

第1電極及び／又は第2電極が、絶縁体に固定されており、該絶縁体が透明材料で構成さ
50

れていることが好ましい。また、第1電極及び／又は第2電極が、それぞれ互いに並列に接続された複数の電極から構成されていても良い。

【0018】

【発明の実施の形態】

以下、図面を参照して本発明の実施の形態を説明する。

【0019】

図1は本発明の第1の電気泳動装置を示す模式図である。

【0020】

電気泳動装置は、第1電極11、半透膜12、バイオチップ13、検体溶液槽15、第2電極14から構成され、第1電極11、半透膜12、及びバイオチップ13の順に積層されて密着している。バイオチップ13と第2電極14の間には、所定の体積を持つ検体溶液槽15がある。第1電極11と第2電極14の間に電源16により電圧を印加することができる。図中、17はこれらの要素を保持するための支持体であり、絶縁材料から構成される。
10

【0021】

図2は本発明の第2の電気泳動装置を示す模式図である。

【0022】

電気泳動装置は、第1電極21、バッファー溶液槽29、半透膜22、バイオチップ23、検体溶液槽25、第2電極24から構成され、第1電極21と半透膜22の間に所定の体積を持つバッファー溶液槽29があり、半透膜22及びバイオチップ23は順に積層されて密着し、バイオチップ23と第2電極24の間に所定の体積を持つ検体溶液槽25がある。
20

【0023】

電源26により第1電極21と第2電極24の間に電圧を印加することができる。図中、27はこれらの要素を保持するための支持体であり、絶縁材料から構成される。

【0024】

図2で示した第1電極及び第2電極は、図3～図5に示す配置となっても構わない。

【0025】

すなわち、図4の模式図に示すような形状が挙げられる。ここで、第1電極31および第2電極34は互いに並列に接続された複数の電極からなり、図4と図5はそれぞれ第1電極および第2電極を垂直に見たときの模式図を示す。第1電極31および第2電極34それぞれは互いに並列に接続された4個の電極から構成され、30は透明な絶縁体である。
30

【0026】

第1電極および第2電極の材料としては、グラファイト、白金、金、金属に金メッキしたもの等が挙げられる。さらに電極は絶縁体に固定され、且つ該絶縁体が透明材料であることが好ましい。そのような例としては、ガラス、ポリエチレンテレフタレートフィルムなどの透明基板に、酸化スズ、ITO、金または白金等を主たる構成材料とする薄膜またはその積層体が部分的に形成された透明電極が挙げられる。

【0027】

第1電極および第2電極の大きさ、形状および配置は、検体溶液槽とバイオチップに均一の電圧を印加することができるものであれば特に限定しないが、例えば、平板上または平板メッシュ状の形態で、バイオチップと平行な位置に配置されていることが好ましい。
40

【0028】

本発明において、「半透膜」とは、検体分子は透過せず、溶液中の水や塩類のような低分子は透過するような膜をいう。そのような膜を使用し、バイオチップに積層・密着して配置することにより、検体溶液中の検体がバイオチップを通過して、第1電極への吸着、及び電極反応により変質することを防止することができる。

【0029】

さらには、検体溶液中の検体がバイオチップ中及び／又はその近傍に濃縮され、微量な検体を効率よくハイブリダイズすることができる。

【 0 0 3 0 】

半透膜としては、使用する検体により適宜選択される。半透膜を透過することのできる分子の大きさは一般にカットオフ分子量とよばれ、数千から数十万のものが市販されている。検出しようとしている検体より小さいカットオフ分子量を示す半透膜を選択すればよい。そのような半透膜としては、ゼラチン膜、アセテート膜、アクリルアミド系やポリビニルアルコール等のハイドロゲル、再生セルロース膜等が挙げられる。機械的強度、取り扱い、入手の容易性等を考慮し、アセテート膜が好ましい。

【 0 0 3 1 】

次に、図6を使用し、本発明の「バイオチップ」に関して説明する。図6はバイオチップの一例を示す模式図である。図中、41は核酸等の生体関連物質プローブ（以下、プローブ）が固定化されたアクリルアミド、アガロース等の高分子ゲル、42はゲル41を保持している中空纖維、43は中空纖維42を接着しているマトリックスを表す。
10

【 0 0 3 2 】

図6では中空纖維の中空部にプローブを固定化したゲルを充填した形態物を例示したが、厚み方向にプローブが固定されたゲルが貫通孔に充填されものであればいずれの形状でも構わない。中空纖維以外のゲルを保持する電気泳動担体としては、例えば、積層された複数のシート状部材やブロック状部材にレーザー等で貫通孔を穿ち、その中にプローブを固定したゲルを注入したのちシート化した電気泳動担体などが挙げられる。

【 0 0 3 3 】

バイオチップの厚みは、数十ミクロンから1mm程度の範囲である。大きさは、数ミリ角20から数センチ角のものが通常、使用される。

【 0 0 3 4 】

本発明において、「検体溶液槽」とは、所定の容積を持つ空間であり、検体溶液が充填される。微量の検体を検出するためには検体溶液が少ないことが好ましい。よって、空間の容積はより微小化することが好ましく、検体溶液槽はバイオチップのプローブが固定された部分にほぼ等しい断面積からなり、検体溶液槽の厚さは、各要素の加工性を考慮し、250μmから3mm程度の厚さであることが好ましい。溶液槽の形状は特に限定せず任意に選択することができる。

【 0 0 3 5 】

本発明において、「バッファー溶液槽」とは、所定の容積を持つ空間であり、バッファー溶液が充填される。所定の容積を持つバッファー槽を設けることで、バイオチップと第1電極を隔離することができる。バイオチップと第1電極を隔離することにより、バイオチップが電極近傍のpH上昇により劣化したり、反応阻害の影響をうけないようにすることができます。
30

【 0 0 3 6 】

また、電極近傍で発生する気体によって、バイオチップに印加される電場が不均一になることを防止することができる。バッファー溶液槽の体積及び形状は特に限定されず任意に選択することができる。

【 0 0 3 7 】

バッファー溶液の組成としては、一般的に核酸のハイブリダイズ反応に利用される溶液組成が上げられ、TBE溶液やSSC溶液などが挙げられる。
40

【 0 0 3 8 】

次に、上記電気泳動装置を使用した検出方法について、検体として核酸を含む溶液を使用した場合の検出方法について説明する。しかし、核酸の検出には限定されない。

【 0 0 3 9 】

核酸の検出は、電気泳動装置の検体溶液槽に、検体核酸溶液を充填し、第1電極と第2電極の間に、第1電極が正極となるように電圧を印加し、バイオチップ表面およびバイオチップ中に検体を移動、濃縮して、核酸検出プローブと検体を反応させることにより実施される。

【 0 0 4 0 】

バイオチップは半透膜に密着して積層しているため、検体溶液中の核酸は、電圧の印加によりバイオチップ表面のゲル近傍に移動して濃縮される。よって、ゲル中のプローブと高い効率でハイブリダイズすることができる。

【 0 0 4 1 】

また、検体溶液中の核酸は、バイオチップを通過してもバイオチップのゲル近傍にとどまることから、高い電圧を印加して短時間で濃縮することが可能である。

【 0 0 4 2 】

好ましくは、第2の実施形態に示すように、半透膜と第1電極の間にバッファー槽を設けることにより、バイオチップを正極と隔離し、電気泳動に伴う正極近傍の溶液のpH上昇による核酸ハイブリッドのTmの低下による解離が回避され、ゲル中のプローブと検体が高い効率でハイブリダイズすることができる。
10

【 0 0 4 3 】

ハイブリダイズ操作が終了した後、ハイブリダイズしなかった検体成分は、バイオチップをバッファー液等で洗浄することにより、除去することができるが、バイオチップに電圧を印加し、洗浄することもできる。

【 0 0 4 4 】

電圧の印可による洗浄方法は、具体的には、プローブと検体を反応させた後、第1電極が負極となるように電圧を印加して、半透膜に積層されたバイオチップ表面およびバイオチップ中の反応しなかった検体を検体溶液槽に移動させることにより実施することができる。
20 この洗浄方法は、上記の濃縮操作に引き続き実施することができる。

【 0 0 4 5 】

以上に述べた検出法において、検体核酸を公知の方法で蛍光分子により標識しておけば、ハイブリダイズした検体を蛍光検出により検出することができる。ハイブリダイズした検体の検出は、上記洗浄操作の後、電気泳動装置から取り出して実施することができるが、第1電極または第2電極を透明電極で構成するか、あるいは、電極をバイオチップの外側に配置することにより、バイオチップを電気泳動装置から取り出さないで検出操作を行うことができる。

【 0 0 4 6 】

すなわち、検出光を第1電極または第2電極の形成する平面を透過して、バイオチップに照射し、バイオチップ上の検体分子に結合した蛍光分子の蛍光を検出することができる。
30

【 0 0 4 7 】

第1電極および/または第2電極は、透明電極で構成することができるが、経済性の観点からは、図3～図5に示すような構成が好ましい。ここで用いられる透明な絶縁体30は、蛍光検出時のノイズを極小化させる観点より、ガラス、PMMA、ポリスチレンなどから選択することが好ましい。

【 0 0 4 8 】

検出に用いる励起光はレーザー、水銀ランプまたはハロゲンランプ等の光源からフィルターにより濾過した光が用いられる。蛍光は、CCD、ホトダイオードなどによって検出することができる。

【 0 0 4 9 】

ハイブリダイズした検体の蛍光検出による検出は、前述の濃縮工程および洗浄工程が終了した後に行ってもよいが、濃縮工程および洗浄工程において断続的に検体分子の蛍光を検出して、バイオチップ上の検体分子の蛍光を経時的に検出することもできる。本方法によれば、最適な濃縮条件/洗浄条件の異なるプローブスポットを同一のバイオチップで同一の実験によって検出することができ、プローブ設計が自由に行える利点がある。
40

【 0 0 5 0 】

【 実施例 】

以下、本発明を実施例により具体的に説明する。

【 0 0 5 1 】

<実施例1>

(1) バイオチップの作製 :

板の中央部に直径 0.32 mm の孔が 0.42 mm 間隔で、格子状に 5 × 5、25 個配置された、厚さ 0.1 mm の多孔板 2 枚を用い、その多孔板の全ての孔に、ポリメチルメタクリレート製中空纖維（外径 0.28 mm、内径 0.16 mm、長さ 500 mm）を通過させた。次に、この 2 枚の多孔板を 50 mm の間に広げ、その間をカーボンブラックで着色したポリウレタン樹脂で長さ 50 mm、20 mm 角の角柱状に包埋した。両端に樹脂で固定化されない部分を有する中空纖維配列体を得た。20 mm 角の角柱状の中央部 2.1 mm 角の中に 25 本の中空纖維が配列されていた。

【 0052 】

得られた中空纖維配列体中の 22 本の中空纖維にゲル前駆体溶液のみを充填した。残り 3 本の中空纖維に 40 ベースの核酸プローブ A を含むゲル前駆体溶液を充填し、重合させた。その後、ミクロトームにて、纖維軸と直角方向に、厚さ 0.5 mm の薄片を切り出し、バイオチップを得た。

【 0053 】

(2) 検体の検出 - 1 :

得られたバイオチップを図 2 に示すように組み立てて、電気泳動装置を得た。ここで、バイオチップは周囲をトリミングして 10 mm 角とした。半透膜はスペクトロポア社製 カットオフ分子量 3500 を、電極はステンレス製の板に金メッキ処理をしたもの用いた。空間 25、29 の厚みは何れも 1 mm とした。空間 29 には 0.5 × TB、30 mM NaCl を 100 μl 充填した。空間 25 には、プローブ A と相補的に結合する 40 ベースの Cy 5 染料で標識された核酸検体 a の 100 fmol とプローブ A と相補的に結合しない 40 ベースの Cy 3 染料で標識された核酸検体 b の 100 fmol を 0.5 × TB、30 mM NaCl 溶液 100 μl に溶解して充填した。

【 0054 】

次に、第 1 電極を正極に、第 2 電極を負極になるように電源 26 により電圧を印加し、検体を濃縮してハイブリダイズさせた。このときの印加電圧は 3 V、時間は 10 分であった。電気泳動終了後、バイオチップを電気泳動装置から取り外し、2 × SSC、0.05% SDS 溶液 10 ml で 20 分間洗浄し、更に同溶液で 20 分間洗浄し、最後に 2 × SSC で 20 分間洗浄した。温度は何れも 45 °C であった。洗浄操作後、バイオチップを取り出し蛍光顕微鏡で観察した。

【 0055 】

その結果、バイオチップのプローブ A が固定化されている 3ヶ所のスポットのみ Cy 5 染料が発する蛍光を検出することができた。Cy 3 染料が発する蛍光は、何れのスポットからも検出されなかった。

【 0056 】

< 実施例 2 >

実施例 1 で得られたバイオチップを図 3 に示すように組み立てて電気泳動装置を得た。ただしここで、空間 35 の厚みは 1 mm、空間 39 の厚みは 20 mm とした。ここで、第 1 電極 31、第 2 電極 34 は何れも 0.5 mm の白金線を用い、PMMA 板 30 に埋め込んで空間 35 および 39 に満たされる溶液と接触させた。それ以外は実施例 1 と同様にして、電気泳動による濃縮とハイブリダイズ、電気泳動による洗浄を行った。次に、空間 35 の検体溶液を 0.5 × TB、30 mM NaCl 水溶液に置換したのち PMMA 板 30 を通してバイオチップを蛍光顕微鏡で観察した。

【 0057 】

その結果、バイオチップのプローブ A が固定化されている 3ヶ所のスポットのみ Cy 5 染料が発する蛍光を検出することができた。Cy 3 染料が発する蛍光は、何れのスポットからも検出されなかった。

【 0058 】

< 比較例 1 >

電気泳動による濃縮とハイブリダイズを行う代わりに、電圧を印加しないで 10 分間静置

10

20

30

40

50

する以外は実施例 2 とすべて同様にハイブリダイズおよび電気泳動による洗浄を行い、実施例と同様にバイオチップを蛍光顕微鏡で観察した。

【 0 0 5 9 】

その結果、バイオチップのプローブ A が固定化されている 3ヶ所のスポットのみ Cy 5 染料が発する蛍光を検出することができたが、その蛍光強度は実施例 1、実施例 2 に比較して著しく低かった。以上の結果を表 1 に示す。

【 0 0 6 0 】

<表 1 >

	実施例 1	実施例 2	比較例 1
プローブ A の蛍光強度	44000	48000	11000
プランクゲルの蛍光強度	4800	9000	6200
S/N	9.2	5.3	1.8

10

【 0 0 6 1 】

【発明の効果】

20

安価な検出装置を用いて、より微量の検体を、できるだけ短時間に効率よく検出することが可能な電気泳動装置および核酸等の生体関連物質の検出法が提供される。

【図面の簡単な説明】

- 【図 1】電気泳動装置の模式図である。
- 【図 2】電気泳動装置の模式図である。
- 【図 3】電気泳動装置の模式図である。
- 【図 4】図 3 の電極の配置を示す模式図である。
- 【図 5】図 3 の電極の配置を示す模式図である。
- 【図 6】バイオチップ表面の模式図である。

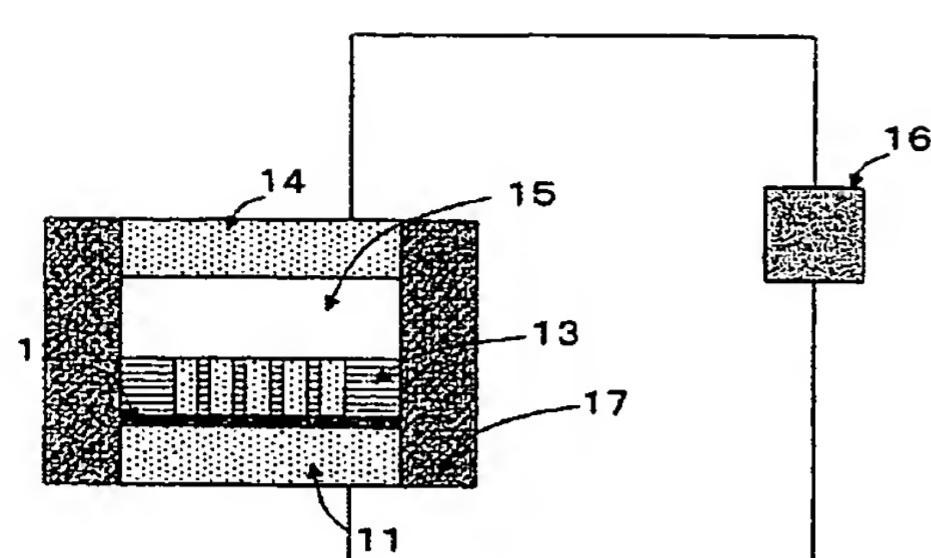
【符号の説明】

30

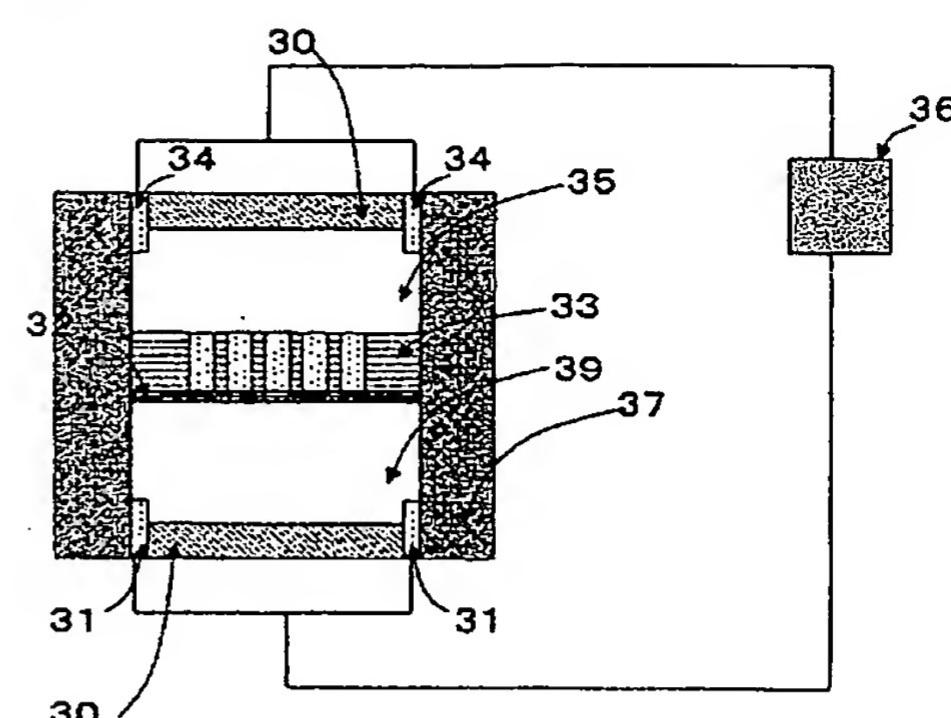
- 1 1、2 1、3 1 第 1 電極
- 1 2、2 2、3 2 半透膜
- 1 3、1 3、3 3 バイオチップ
- 1 4、2 4、3 4 第 2 電極
- 1 5、2 5、3 5 検体溶液槽
- 2 9、3 9 バッファー溶液槽
- 4 1 生体関連物質が固定化されたゲル
- 4 2 ゲルを保持している中空纖維
- 4 3 中空纖維を接着しているマトリックス
- 1 7、2 7、3 7 支持体
- 3 0 透明絶縁体
- 1 6、2 6、3 6 電源

40

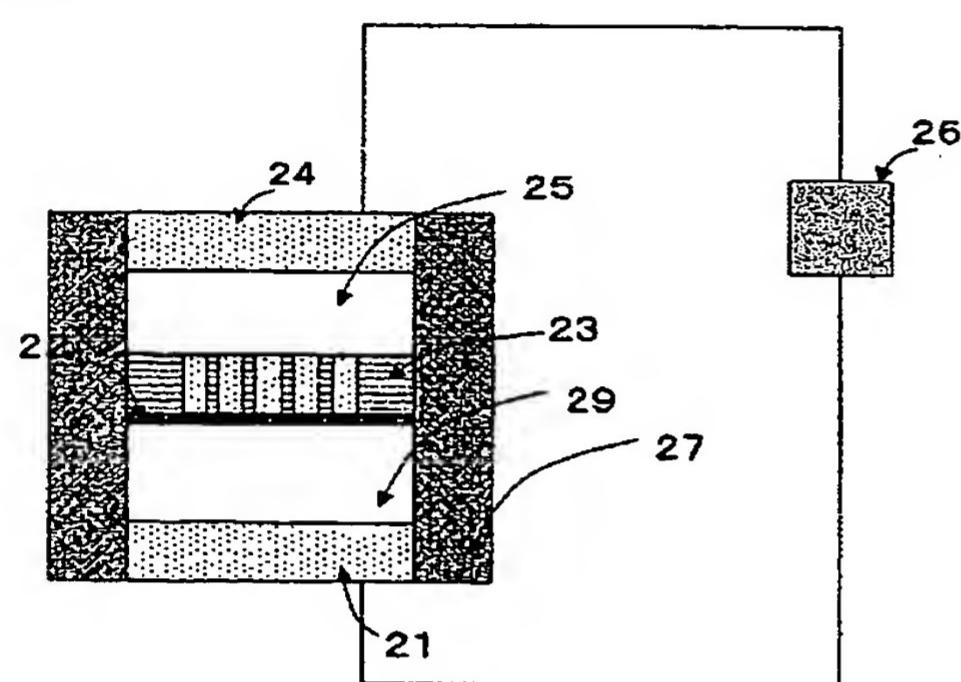
【 図 1 】



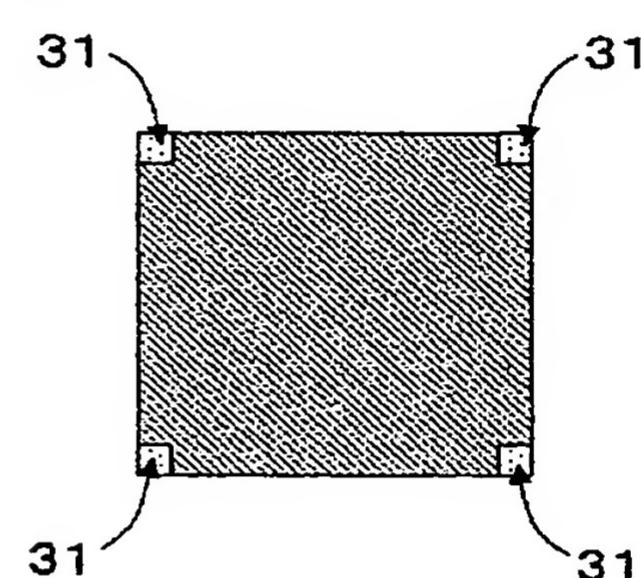
【 図 3 】



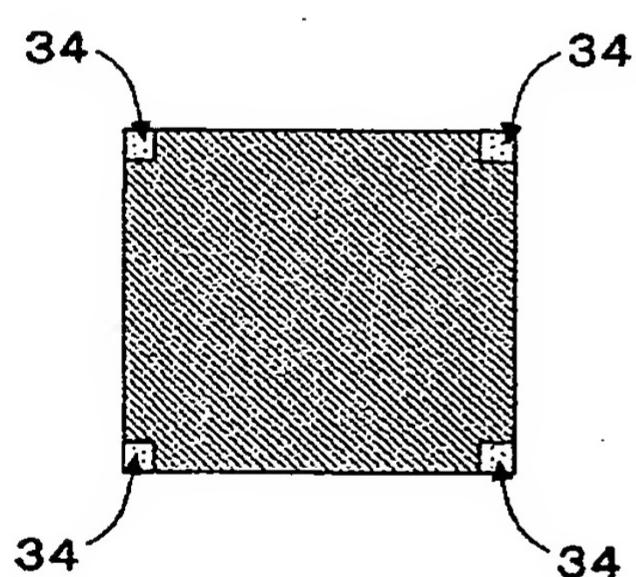
【 図 2 】



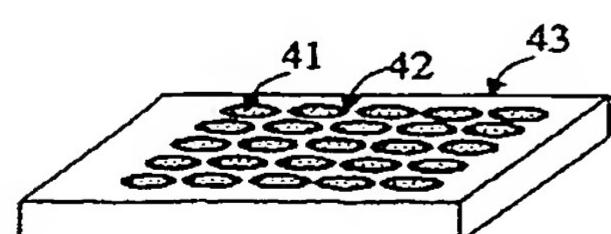
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(51) Int.CI.⁷

F I

テーマコード (参考)

G 0 1 N	21/77	G 0 1 N	21/78	C
G 0 1 N	21/78	G 0 1 N	37/00	1 0 2
G 0 1 N	27/447	G 0 1 N	27/26	3 1 5 Z
G 0 1 N	37/00	G 0 1 N	27/26	3 2 5 A
		C 1 2 N	15/00	A
		C 1 2 N	15/00	F

F ターム(参考) 4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC01 CC02 CC03 CC11 FA12 FA15
4B063 QA01 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR38 QR55 QR84 QS16 QS34
QS36 QX02